

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Detail 54(1- 62)

**Publication No.** : 1020030020232 (20030308)**Application No.** : 1020020048128 (20020814)**Title of
Invention** : PROCESS FOR PRODUCING HYDROGEL BIOCHIP BY USING EPOXY-CONTAINED RADIAL
POLYETHYLENE GLYCOL DERIVATIVE**Document
Code** : A**IPC** : C12Q 1/68**Priority** : KR1020010053687(20010901)**Applicant** : SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.**Inventor** : HUH, NAM, PARK, GA YEONG, PARK, JONG MYEON, SONG, MI JEONG**Abstract :**

PURPOSE: Provided is a process for producing a hydrogel biochip having 3-dimensional structure and improved sensitivity by using an epoxy-contained radial polyethylene glycol derivative.

CONSTITUTION: The process comprises the steps of: reacting the radial polyethylene glycol having an epoxy group at the end thereof and a low molecular weight hydrophilic polymer to prepare a matrix, wherein the hydrophilic polymer has an average molecular weight of 60-100,000 and is a polyethylene glycol having hydroxy, amino, or thiol; covalently bonding a probe to the matrix to prepare a matrix-probe conjugation body, wherein the probe is nucleic acid(DNA, RNA, or PNA), protein, or oligopeptide; fixing the matrix-probe conjugation body to a solid substrate such as glass, quartz, silicone, plastic, polypropylene, polycarbonate, or activated acrylamide.

© KIPO 2003

Legal Status :

1. Application for a patent (20020814)

(19) 대한민국특허청 (KR)
(12) 공개특허공보 (A)

(51) . Int. Cl. 7
C12Q 1/68

(11) 공개번호 2003-0020232
(43) 공개일자 2003년03월08일

(21) 출원번호 10-2002-0048128
(22) 출원일자 2002년08월14일

(30) 우선권주장 1020010053687 2001년09월01일 대한민국(KR)

(71) 출원인 삼성전자주식회사
경기도 수원시 팔달구 매탄3동 416번지

(72) 발명자 허남
서울특별시서초구서초동1335무지개아파트5동1101호
송미정
대전광역시유성구전민동세종아파트111동1205호
박종면
대전광역시유성구전민동세종아파트101동807호
박가영
경기도용인시기흥읍농서리산14번지기숙사C419호

(74) 대리인 이영필
이해영

심사청구 : 있음

(54) 에폭시기를 갖는 방사형 폴리에틸렌글리콜 유도체를이용한 하이드로 젤 바이오칩의 제조방법

요약

본 발명은 말단에 에폭시기를 가진 방사형 폴리에틸렌글리콜과 저분자의 친수성 폴리머를 반응시켜 매트릭스를 형성한 다음, 그 매트릭스에 프로브를 공유결합시키고, 이어 교체 기판에 고정화시키는 바이오칩의 제조방법 및 그에 의해 제조된 바이오칩에 관한 것이다.

본 발명에 의하면, 표면으로부터 공간적으로 돌출되어 있는 형태에 의한 3차원적인 구조를 갖는 바이오칩의 생산이 가능하여 칩의 민감도를 획기적으로 증가시킬 뿐만 아니라, 저렴한 비용과 간단하고 효율적인 공정에 의해 수용액상에서 칩을 제조할 수 있다.

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 HNF-1a 정상인 유전자의 전장을 표적 핵산으로 사용하여 혼성화한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2는 HNF-1a 유전자 엑손9 구간의 5613번째 뉴클레오타이드 바로 뒤에 뉴클레오타이드 A를 삽입한 이형접합자를 표적 핵산으로 사용하여 혼성화한 결과를 나타내는 사진이다.

도 3은 본 발명의 실시예6에 의하여 제조된 바이오칩을 표적 핵산과 혼성화한 후, 형광을 스캐닝한 결과를 나타내는 사진이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 바이오칩의 제조 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 젤 매트릭스를 이용하여 바이오칩을 제조하는 방법에 관한 것이다.

인간 지놈 프로젝트의 경이적인 진행과 함께, 유전병의 진단, 치료 및 예방에 있어서 막대한 양의 유전자 정보를 신속히 제공할 수 있는 방법에 대한 요구가 크게 증가하였다. 염기서열 분석법으로 사용되어 온 생거(Sanger)의 방법은 DNA를 복제하는 중합효소연쇄반응(PCR; polymerase chain reaction)법의 개발 및 이의 자동화 등에 의해 꾸준히 발전하였음에도 불구하고, 과정이 번거롭고 많은 시간과 노력, 비용 및 고도의 숙련도를 필요로 하기 때문에, 방대한 양의 유전자를 분석할 수 없어, 새로운 염기서열 분석 시스템이 끊임없이 모색되었다. 그 결과 지난 수년간 DNA칩의 제작, 이 용기술과 관련된 많은 부분에서 진보가 있었다.

DNA칩이란 1평방 인치 미만의 작은 면적의 실리콘, 표면개질유리, 폴리프로필렌, 활성화 폴리아크릴아미드와 같은 고체 표면에 염기서열이 알려진 작게는 수 개, 크게는 수백 개의 염기 크기의 올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide) 프로브(probe)를 수백 내지 수십만 개의 정해진 위치에 부착시켜 미세집적(microarray)시킨 것을 통칭한다. 이러한 DNA칩에 분석하고자 하는 표적 DNA(target DNA) 단편을 결합시키면, DNA칩에 부착되어 있는 프로브들과 표적 DNA 단편상의 염기서열의 상보적인 정도에 따라 각기 다른 혼성화 결합(hybridization) 상태를 이루게 되는데, 이를 광학적인 방법 또는 방사능 화학적 방법 등을 통해 관찰 해석함으로써 표적 DNA의 염기서열을 분석할 수 있다.

DNA 칩을 사용하면, DNA 분석 시스템의 소형화를 이루어 극미량의 시료만으로도 유전자 분석이 가능하며, 표적 DNA 상의 여러 군데의 염기서열을 동시에 규명할 수 있게 함으로써, 간편하고도 저렴할 뿐만 아니라 신속하게 유전 정보를 제공할 수 있다. 또한, DNA 칩은 방대한 양의 유전 정보를 단시간 내에 동시에 분석할 수 있을 뿐만 아니라, 유전자 간의 상호 연관성까지 규명할 수 있게 되어, 앞으로 유전병 및 암의 진단, 돌연변이의 탐색, 병원균의 검출, 유전자 발현 분석, 신약 개발 등 폭넓은 응용분야가 예상된다. 또한, 미생물이나 환경오염의 감지기로 이용하여, 해독물질에 대한 유전자를 찾아내어 유전자 제조할 기술을 적용함으로써, 해독물질을 대량 생산하거나 의약품 농작물, 저 지방 함유 육류의 생산에도 응용할 수 있는 등 거의 대부분의 생물관련 산업에 혁명적인 발전을 가져올 수 있다.

DNA 칩은 사용된 프로브의 종류에 따라 올리고 칩 과 cDNA 칩으로 구분하기도 하고, 제작된 방법에 따라 포토리소그래피 칩과 펀 방식의 스폿팅 칩, 잉크젯 방식의 스폿팅 칩, 전기를 이용하여 DNA를 기판에 집적시키는 칩(electronic addressing DNA chip) 등으로 분류하기도 한다.

1세대 DNA칩은 올리고뉴클레오타이드를 기판 위에 직접 단층으로 부착시킨 형태로서(2D type chip), 부착된 프로브간의 정량적 변동(spot to spot variation) 때문에 혼성화 결합 정도의 상대적인 비교를 하는데 있어서 상당한 오차를 발생시키며, 민감도(sensitivity)가 낮기 때문에 칩에 혼성화된 DNA를 검출하기 위해서는 값비싼 공초점 현미경(confocal fluorescence microscope)을 필요로 하는 단점을 가지고 있고, 또는, 고체 기질의 표면 처리과정에서, 화학적인 반응의 진행을 위하여 유기용매와 수용액을 혼합하여 사용해야 하는 번거로움이 있었다.

1세대 DNA칩의 일예에 해당하는 미국특허 제5,744,305호는 광에 불안정한 보호기(photolabile protecting groups)와 포토리소그래피 방법을 사용하여, 다양한 종류의 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드 등 폴리머를 기판 위에 배열(array)시키는 내용을 개시하고 있다.

상기 1세대 DNA칩의 단점을 개선하기 위해, 다음과 같은 2세대 DNA칩이 개발되었다. 미국특허 제5,736,257호 및 제5,847,019호는 기판 표면의 -OH기와 실란(silanes)을 반응시켜 기판 위에 비닐 기의 분자층(molecular layer)을 형성한 다음, 그 분자층 위에서 아크릴아마이드의 폴리머화 반응을 수행하여 네트워크 층을 만들고, 그 네트워크 층을 광으로 활성화시켜 패턴화하여 바이오물질을 결합시키는 바이오칩의 제조방법을 개시하고 있다. 이 방법은 비닐기의 분자층 표면에 형성된 폴리아크릴아마이드 네트워크의 3차원 겹을 이용하므로써, 부착된 프로브간의 정량적 변동폭 감소 그리고 칩의 민감도를 향상시키는 효과가 있으나, 고비용과 장시간이 요구되는 단점을 가지고 있다.

또한, 미국특허 제5,552,270호, 제5,741,700호 및 제5,770,721호는 올리고뉴클레오타이드 어레이(array)를 가지는 매트릭스와 고체 기판을 포함하는 2세대 DNA칩을 사용하여, DNA 서열을 분석하는 방법을 기술하고 있다. 상기 매트릭스는 일정 간격으로 떨어져 있는 수많은 정사각형 "도트" (square "dots") 형태의 겹층(gel layer)에 의해 고체 기판에 붙어 있다. 칩은 30um 떨어진 두개의 유리 슬라이드 사이에 폴리아크릴아마이드 겹층 형성시킨 다음, 슬라이드 1개(100x100x30 μm^3)를 제거하고, 겹이 코팅된 나머지 슬라이드를 건조시켜, 도트 형태(100x100x30 μm^3)의 겹이 남도록 겹의 일부분을 기계적으로 혹은 레이저를 사용하여 제거하므로써 제조한다. 겹층의 아미드기는 반응성을 갖춘 하이드라이드(hydrazide)형태로 화학 변형시키고, 또한 5' 말단에 N-메틸유리딘(N-methyluridine)을 가진 DNA 프로브는 다이알데하이드로 변형시킨 다음, 이들을 서로 반응시킴으로써 올리고뉴클레오타이드 프로브를 기판에 3차원으로 고정화시킨다.

상기 DNA칩은 1일 내지 2일의 장시간을 요구하는 다단계 공정에 의해 제조되며, 각 단계후에 철저한 세척공정을 요구하고, 반응 환경에 따른 균일한 결과의 수득이 용이하지 않고, 겹 표면과 표적 DNA간의 불규칙한 흡착이 발생하여 배경 노이즈(background noise)를 증가시키는 단점을 가지고 있다.

WO 00/65097 및 WO 00/2899에는 이소시아네이트(isocyanate, NCO) 기를 갖는 하이드로 겹을 이용하는 3차원 DNA칩이 개시되어 있다. 하이드로 겹은, 탈수 상태에서는 유리질(glassy)이나 물의 존재하에서는 겹을 형성하여 부풀게 되는 친수성 네트워크 폴리머를 의미한다. 이 문헌에 의하면, 이소시아네이트 기는 하이드로 겹과 프로브의 공유결합 뿐만 아니라 하이드로 겹의 중합에도 관여한다. 이소시아네이트 기를 갖는 하이드로 겹(예를 들면, 이소시아네이트 기를 갖는 폴리에틸렌옥사이드, 혹은 이소시아네이트 기를 갖는 폴리에틸렌옥사이드와 폴리프로필렌옥사이드의 공중합체)과, 5' 말단에 아민기를 갖는 프로브를 수용액상에서 함께 혼합하여, 프로브를 겹에 3차원으로 고정화시킨 다음, 유리 표면의 아민기와 반응케함으로써, 프로브를 기판에 부착시킨다.

그러나, 이소시아네이트 기는 제어가 어려울 정도로 신속히 가수분해되므로 이를 방지하기 위해 저온에서 DNA칩 제조가 수행되어야 하고, 프로브의 공유결합과 중합반응에 소모되지 않은 이소시아네이트 기들의 가수분해가 진행될수록 고분자화가 이루어지고 그 물성의 점도 증가로 인하여 스폿팅 핀(spotting pin) 내에서 고형화가 진행될 수 있으며, 이산화탄소 가스의 발생으로 스폿팅 사이즈의 제어가 어렵다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 주된 목적은, 민감도가 개선되고 제조가 용이한 하이드로 젤 바이오칩을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은, 민감도가 개선된 바이오칩의 제조방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 기판상에 말단에 에폭시기를 가진 방사형 폴리에틸렌글리콜 유도체와 친수성 폴리머 가교제를 함유하는 매트릭스와 프로브를 포함하는 하이드로 젤을 형성하는 단계를 포함하는 바이오칩의 제조방법을 제공한다.

본 발명의 하이드로 젤 바이오칩의 제조방법은 말단에 에폭시기를 가진 방사형 폴리에틸렌글리콜 유도체와 친수성 폴리머 가교제의 매트릭스를 형성하는 단계와 상기 매트릭스에 프로브를 반응시켜 매트릭스-프로브 접합체를 제조하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 이를 좀더 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

먼저, 방사형 폴리에틸렌글리콜을 과량의 에피클로로하이드린과 수산화나트륨과 반응시켜서 그의 말단에 에폭시기를 부착한다. 이어, 저분자의 친수성 폴리머, 바람직하게는 히드록시기, 아미노기 또는 티올기의 친수성 기를 가지며 평균 분자량 60~100,000의 폴리머를 가교제로 사용하여 매트릭스를 형성한 다음, 친핵성기를 말단에 가지는 프로브를 상기 매트릭스에 공유결합시켜, 매트릭스-프로브 접합체를 제조한다. 매트릭스 형성 공정과 매트릭스-프로브 접합체 제조 공정은 순차적으로 혹은 동시에 수행될 수 있다. 본 명세서에 사용된 프로브란 용어는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있어, 이들 간의 결합을 분석함으로써 표적 물질의 특성을 예측할 수 있게 하는 모든 물질을 말하는 것이다. 바람직하기로, DNA, RNA 또는 PNA를 포함하는 핵산, 단백질 또는 올리고펩타이드이다. 본 발명에 사용된 저분자의 친수성 폴리머는, 예를 들면, 평균 분자량 60~100,000의 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌아민, 폴리프로필렌옥사이드 및 폴리에틸렌 옥사이드 등이 될 수 있다. 또한, 본 명세서에 있어서 "방사형 폴리에틸렌 글리콜"이란 3방향 이상으로 분지된 가지를 가지고 있어, 방사형을 띠는 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 의미한다. 따라서, 본 발명의 에폭시기를 갖는 방사형 폴리에틸렌 글리콜 유도체는 가교제에 의하여 가교되는 경우, 3차원적인 중합체 매트릭스를 형성할 수 있다.

본 발명에서는 상기 매트릭스-프로브 접합체를 고체 기판, 바람직하게는 아민기를 갖도록 표면처리된 고체기판 위에 마이크로스팟팅하여 프로브를 기판에 고정화시키므로써 하이드로 젤 바이오칩을 제조할 수 있다. 상기 고체 기판의 재질은 유리, 석영, 실리콘, 플라스틱, 폴리프로필렌, 폴리카보네이트 또는 활성화된 아크릴아마이드 등이 포함된다.

또한, 하이드로 젤 바이오칩의 제조방법은 말단에 에폭시기를 가진 방사형 폴리에틸렌글리콜 유도체, 친수성 폴리머 가교제 및 프로브를 포함하는 혼합 용액을 형성하는 단계와 상기 혼합 용액을 상기 기판상에 고정화하는 단계를 포함할 수 있다.

상기 고정화는 예를 들면, 온도는 40℃~70℃이고, 습도는 60%~30%인 조건에서 수행될 수 있다. 상기 고정화 조건은 바람직하기로, 40℃ 및 60%, 60℃ 및 40%, 70℃ 및 30%의 온도 및 습도 조건에 진행되는 것이다. 이러한 고정화 단계의 결과 형성되는 기판상의 스팟의 특성은 가교제의 종류, 혼합 비율, 온도 및 습도와 같은 반응 조건에 따라 변화될 수 있다. 그외의 상기 폴리에틸렌 유도체, 친수성 폴리머 가교제, 프로브 및 기판에 대한 사항은 상기한 바와 같다.

본 발명은 또한, 상기 하이드로 젤 바이오칩의 제조방법에 의하여 제조되는 바이오칩을 제공한다. 본 발명의 바이오칩은 고체 기판, 상기 기판에 공유결합되어 있으며, 말단에 에폭시기를 가진 방사형 폴리에틸렌글리콜과 친수성 폴리머 가교제의 반응 생성물인 매트릭스 및 상기 매트릭스에 공유결합된 프로브를 포함하는 것이다.

또한, 본 발명은 상기 하이드로 젤 바이오칩의 제조방법에 따라 제조된 하이드로 젤 바이오칩에 프로브와 결합하는 표적 물질을 포함하는 시료를 적용하는 단계와 상기 프로브에 특이적으로 결합된 표적 물질을 검출하는 단계를 포함하는 프로브와 표적 물질간의 결합을 분석하는 방법을 제공한다. 검출이 용이하도록 표적 물질은 형광염료 등의 신호유발 물질이 부착된 프로브가 바람직하다. 프로브와 표적 물질간의 결합에 대한 검출은 표적 물질에 붙여주는 신호유발 물질의 종류에 따라, 현재 많이 사용되고 있는 형광 검출법, 전기화학적 검출법, 질량 변화를 이용한 검출법, 전하량 변화를 이용한 검출법 또는 광학적 신호의 차이를 이용한 검출법 등 다양한 방법에 의해 수행될 수 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다.

이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

실시예 1: 에폭시기를 갖는 방사형 폴리에틸렌글리콜 유도체의 합성
실시예 1: 에폭시기를 갖는 방사형 폴리에틸렌글리콜 유도체의 합성

NaOH 수용액(50 wt%, 2mL)에 에피클로로하이드린(7.5mL)과 테트라부틸암모늄 브로마이드(tetrabutylammonium bromide, 0.32g)를 첨가하여 교반한 다음, 펜타에리트리올 에톡시레이트(pentaerythritol ethoxylate, 1g)를 천천히 가하고 상온에서 18시간 교반하였다. TLC(thin layer chromatography)로 반응의 종결을 확인하였는데, 반응이 종결되지 않은 경우 60℃에서 1시간 동안 더 교반하였다. 그런 다음, 물(30mL)을 가하여 희석한 후, 메틸렌 클로라이드(40mL)로 세 번 추출하였다. 유기용액 층을 다시 포화 NaHCO_3 (40mL)로 세 번 세척하고 분리하여, 무수 MgSO_4 를 첨가하고 건조시킨 후 저압에서 용매를 제거하였다. 이어, 진공에서 이틀간 건조시키므로써 에피클로로하이드린의 잔여물을 제거하였다. 이렇게 하여 합성된 에폭시기를 갖는 방사형 폴리에틸렌글리콜 유도체는 $^1\text{H NMR}$ 과 0.1N HBr/초산(glacial)을 이용하는 에폭시기의 적정으로 확인하였다.

실시예 2: 다이아민 가교제의 합성
실시예 2: 다이아민 가교제의 합성

DMF(40mL) 용액에 펜타(에틸렌글리콜)디-토실레이트(5g, 9.2mmol)를 용해시키고, NaN_3 (4.2g, 64.1mmol)와 피리딘(0.5 mL)을 순차적으로 첨가한 다음, 140℃에서 18시간 동안 교반하였다. 저압에서 용매를 제거하고, 물(200mL)을 가하면서 교반한 후, 메틸렌 클로라이드(100mL)를 가하여 추출하고, 유기용매 층을 브린(brine, 100 mL)으로 3회 세척하였다. 무수 MgSO_4 를 첨가하여 건조시키고, 저압에서 용매를 제거하여 컬럼 크로마토그래피(flash column chromatography, EA:nHex = 1:2)하드로써 디-아자이드 중간체를 얻었다. 이 중간체를 메탄올(30mL)에 용해시키고, 10% Pd-C (0.1 당량)을 첨가한 후, 수소 가스를 이용하여 18시간 동안 환원반응을 진행시켰다. 셀라이트 패드(Celite pad)를 이용하여 촉매를 제거하고 패드는 메탄올로 세척하였다. 여액과 메탄올 세척액을 혼합하고 저압에서 용매를 제거하여, 다이아민 가교제를 얻었다.

실시예 3: 가교제를 이용한 젤 매트릭스 용액의 제조
실시예 3: 가교제를 이용한 젤 매트릭스 용액의 제조

(1) 다이아민 가교제를 이용한 젤 매트릭스 용액의 제조 (1) 다이아민 가교제를 이용한 젤 매트릭스 용액의 제조

실시예1에서 합성된 에폭시기를 갖는 방사형 폴리에틸렌글리콜 유도체(100mg)를 물(4mL)에 넣어 교반한 다음, 실시예2에서 합성된 다이아민 가교제(5.8 mg)를 첨가하고 18시간 동안 상온에서 교반하여 용액 상태로 4℃에서 보관하였다.

(2) PEG를 가교제로 이용한 젤 매트릭스 용액의 제조 (2) PEG를 가교제로 이용한 젤 매트릭스 용액의 제조

분자량이 200, 400, 600, 1500인 PEG를 각각 2N NaOH가 있는 수용액에 넣고, 빙조에서 교반하여 PEG 가교제 용액을 준비하였다.

그런 다음, 실시예1에서 합성한 에폭시기를 갖는 방사형 폴리에틸렌글리콜 유도체를 카보네이트 완충용액(0.1 M, pH 9.1)에 용해시킨 후, 상기에서 준비한 PEG 가교제 용액을 천천히 주입하고, 3시간 동안 상온에서 교반하였다. 반응이 종결됨을 확인한 후, MC(methylene chloride)로 추출하고 저압에서 용매를 제거하여 4℃에서 보관하였다.

한편, 분자량이 100,000인 PEG를 이용하여 가교제 용액을 제조한 다음, 상술한 방법으로 젤 매트릭스 용액을 제조하면, 고체상태의 생성물을 얻을 수 있었는데, 이 산물은 GPC(gel permeation chromatography)로 검증한 결과, 매트릭스가 형성된 것이 아니고 에폭시기 5~6개를 갖는 이량체 형태의 산물인 것으로 확인되었다. 따라서, 본 발명에서 가교제로 사용될 수 있는 PEG는 분자량이 100,000 미만인 PEG임을 알 수 있었다.

실시예 4: 칩 위에 젤 매트릭스-DNA 접합체 용액의 스폿팅을 통한 바이오칩의 제조
실시예 4: 칩 위에 젤 매트릭스-DNA 접합체 용액의 스폿팅을 통한 바이오칩의 제조

에폭시기를 갖는 방사형 폴리에틸렌글리콜, 가교제, 그리고 올리고뉴클레오타이드의 당량비가 4:1:4로 되도록 올리고뉴클레오타이드 프로브를 실시예3에서 제조한 젤 매트릭스 용액에 첨가하고, 교반하여 37℃에서 14시간 동안 방치함으로써 매트릭스-DNA 접합체를 제조한 다음, 이를 스폿팅 용액으로 하였다.

상기 스폿팅 용액을 아민기를 갖도록 표면처리된 유리 표면 위에 스폿팅한 후, 4시간 동안 37℃의 습한 챔버(wet chamber)에서 방치하였다. 이어, 배경 노이즈의 제어(background control)에 필요한 공정, 즉 표적 핵산이 유리 표면에 부착하지 않도록 하기 위해 스폿팅되지 않은 위치의 유리 표면 아민기가 음전하를 띄도록 반응을 실행하고 건조기에 보관하였다.

실시예 5: 칩 테스트 실시예 5: 칩 테스트

칩 테스트에서, 표적 핵산은 HNF-1 α (hepatocyte nuclear factor-1) 정상인(wild type) 유전자의 전장(full length); 및 멀티플렉스 PCR(multiplex PCR) 방법을 이용하여 HNF-1 α 유전자의 엑손(exon)9 구간을 얻은 다음, 그 구간의 5613번째 뉴클레오타이드 바로 뒤에(3' 쪽으로) 뉴클레오타이드 A를 삽입한 이형접합자(heterozygote type)의 증연변이를 만들어, 프로브와 혼성화되는 표적 핵산으로 사용하였다. 상기 표적 핵산의 PCR 과정에서 Cy3-dUTP를 첨가하므로써, 형광염료가 표지된 표적 핵산을 준비하였다.

그리고, 프로브로는 하기의 올리고뉴클레오타이드(서열번호1 내지 서열번호34)를 사용하였다.

프로브 핵산과 표적 핵산의 혼성화 조건은 0.1% 6SSPET(0.1% Triton X-100를 포함하는 Saline Sodium phosphate EDTA buffer) 용액에 용해된 20nM 농도의 표적 핵산과 매트릭스-DNA 접합체가 고정화된 칩을 37℃에서 16시간 동안 반응시킨 후, 칩을 0.05% 6SSPET와 0.05% 3SSPET으로 각 5분씩 상온에서 세척하고, 5분간 상온에서 건조시켜(air dry)스캐닝하였다. 이때, 스캐닝은 엑손사의 GenePix 4000B 모델을 이용하였다.

서열번호1: tgaacttTggacttc (HNF-1 α 유전자의 프로모터 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 T는 정상인 프로모터 432번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 프로모터 432번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호2: tgaacttGggacttc(서열번호1에서 언급한 정상인 프로모터의 432번째 염기에서 점 돌연변이(point mutation) (A→C)가 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호3: gttttggGggggcag(HNF-1 α 유전자의 프로모터 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 G는 정상인 프로모터 592번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 프로모터 592번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호4: gttttggCggggcag(서열번호3에서 언급한 정상인 프로모터의 592번째 염기에서 점 돌연변이(C→G)가 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호5: tgcagctGgctcagt (HNF-1 α 유전자의 엑손1 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 G는 정상인 엑손1의 733번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 엑손1의 733번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호6: tgcagctAgctcagt (서열번호5에서 언급한 정상인 엑손1의 733번째 염기에서 점 돌연변이(C \rightarrow T)가 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호7: gcactggCtgagccg (HNF-1 α 유전자의 엑손1 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 G는 정상인 엑손1의 806번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 엑손1의 806번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호8: gcactggAtgagccg (서열번호7에서 언급한 정상인 엑손1의 806번째 염기에서 점 돌연변이(C \rightarrow T)가 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호9: caaggggGagtcctg (HNF-1 α 유전자의 엑손1 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 G는 정상인 엑손1의 856번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 엑손1의 856번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호10: caaggggAagtcctg (서열번호9에서 언급한 정상인 엑손1의 856번째 염기에서 점 돌연변이(C \rightarrow T)가 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호11: cggctgaGgggagct (HNF-1 α 유전자의 엑손1 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 G는 정상인 엑손1의 875번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 엑손1의 875번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호12: ggcggtcGagctggc (서열번호11에서 언급한 정상인 엑손1의 875번째 염기부터 879번째 염기까지의 5염기가 결실되는 돌연변이가 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호13: accatctTcgccaca (HNF-1 α 유전자의 엑손2 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 T는 정상인 엑손2의 1778번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 엑손2의 1778번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호14: accatctCcgccaca (서열번호13에서 언급한 정상인 엑손2의 1778번째 염기에서 점 돌연변이가(A \rightarrow G) 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호15: cacaacaTcccacag (HNF-1 α 유전자의 엑손2 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 T는 정상인 엑손2의 1812번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 엑손2의 1812번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호16: cacaacaAcccacag (서열번호15에서 언급한 정상인 엑손2의 1812번째 염기에서 점 돌연변이가(A \rightarrow T) 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호17: gcgggccGccctgta (HNF-1 α 유전자의 엑손2 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 G는 정상인 엑손2의 1910번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 엑손2의 1910번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호18: gcgggccAccctgta (서열번호17에서 언급한 정상인 엑손2의 1910번째 염기에서 점 돌연변이(C \rightarrow T)가 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호19: acctctcGctgcttg (HNF-1 α 유전자의 엑손2 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 G는 정상인 엑손2의 1940번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 엑손2의 1940번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호20: acctctcActgcttg (서열번호19에서 언급한 정상인 엑손2의 1940번째 염기에서 점 돌연변이(C→T)가 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호21: aaggggcGgaggaac (HNF-1 α 유전자의 엑손3 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 G는 정상인 엑손3의 2659번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 엑손3의 2659번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호22: aaggggcAgaggaac (서열번호21에서 언급한 정상인 엑손3의 2659번째 염기에서 점 돌연변이(C→T)가 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호23: gaggaacCgtttcaa (HNF-1 α 유전자의 엑손3 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 C는 정상인 엑손3의 2667번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 엑손3의 2667번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호24: gaggaacTgtttcaa (서열번호23에서 언급한 정상인 엑손3의 2667번째 염기에서 점 돌연변이(G→A)가 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호25: cacctccGtgacgag (HNF-1 α 유전자의 엑손4 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 G는 정상인 엑손4의 3297번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 엑손4의 3297번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호26: cacctccAtgacgag (서열번호25에서 언급한 정상인 엑손4의 3297번째 염기에서 점 돌연변이(C→T)가 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호27: tagacacGcacctcc (HNF-1 α 유전자의 엑손4 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 G는 정상인 엑손4의 3305번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 엑손4의 3305번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호28: tagacacAcacctcc (서열번호27에서 언급한 정상인 엑손4의 3305번째 염기에서 점 돌연변이(C→T)가 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호29: caaccggCgcaaaga (HNF-1 α 유전자의 엑손4 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 C는 정상인 엑손4의 3332번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 엑손4의 3332번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호30: caaccggTgcaaaga (서열번호29에서 언급한 정상인 엑손4의 3332번째 염기에서 점 돌연변이(G→A)가 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호31: cctgagaTgccggcg (HNF-1 α 유전자의 엑손9 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 T는 정상인 엑손9의 5613번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 엑손9의 5613번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호32: cctgagaTgccggc (서열번호31에서 언급한 정상인 엑손9의 5613번째 염기 바로 뒤에 A염기가 삽입되는 돌연변이가 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

서열번호33: tggcgctGagcagggt (HNF-1a 유전자의 엑손 9 구간과 상보적인 프로브로서, 프로브의 가운데 G는 정상인 엑손 9의 5688번째 염기와 쌍을 이루고, 그의 양측에 있는 프로브 염기서열은 엑손 9의 5688번째 염기의 양측에 있는 염기서열과 완벽한 염기쌍을 이룬다.)

서열번호34: tggcgctGagagccg (서열번호33에서 언급한 정상인 엑손 9의 5688번째 염기 바로 뒤에 TC염기가 삽입되는 돌연변이가 유발된 표적 핵산과 상보적인 프로브이다.)

상술한 프로브와 표적 핵산의 혼성화 반응 후 스캐닝 결과는 도1 및 도2에 나타내었다. 도1은 HNF-1a 정상인 유전자의 전장을 표적 핵산으로 사용한 경우이고, 도2는 HNF-1a 유전자 엑손9 구간의 5613번째 뉴클레오타이드 바로 뒤에 뉴클레오타이드 A를 삽입한 이형접합자를 표적 핵산으로 사용한 경우이다.

도1 및 도2에서, 동일한 프로브를 6스폿씩 스포팅하였는데, 좌측 상단부터 오른쪽으로 서열번호1, 2, 3, 4의 프로브가 고정화된 스폿이고, 그 다음 줄에서는 5, 6, 7, 8의 프로브가, 이와 같은 방법으로 서열번호34까지의 프로브가 칩 상에 스포팅되어 있다. 스폿 크기 (spot size)는 $170 \pm 5 \mu\text{m}$ 이고, 스폿간의 간격은 $375 \mu\text{m}$ 로 조절하였다.

각 스폿군의 스폿대스폿의 변이 (spot to spot variation)는 동일 프로브군에 대하여 변이지수 (CV: coefficient of variation)가 8%이었으며, 칩대칩의 변이 (chip to chip variation)는 변이지수가 10.6%이었다. 이는 기존의 2D type의 칩에서 관찰되는 25~30%의 스폿 변이지수 값과 비교할 때, 3차원적인 고정화 기법이 프로브간의 오차를 줄일 수 있는 방법임을 증명하는 것이다. 상기에서, 변이지수는 표준편차 (standard deviation)/평균값의 백분율 (%)를 나타낸다.

도 1에서 보듯이, 돌연변이가 없는 프로브(즉, 서열번호1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33의 프로브)가 고정화된 스폿에서는 돌연변이 유발된 프로브(서열번호2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34의 프로브)가 고정화된 스폿에서 보다 강한 형광을 관찰할 수 있었다. 따라서, HNF-1a 정상인 유전자 전장의 표적 핵산은 돌연변이가 없는 프로브와 완벽한 염기쌍을 이루는 것을 알 수 있었다.

도 2에서 보듯이, 돌연변이가 없는 프로브(즉, 서열번호1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33의 프로브)가 고정화된 스폿에서는 도1에서와 동일한 결과가 나타나는데 반해, 돌연변이 유발된 프로브 중 서열번호 32의 프로브가 고정화된 스폿에서는 도1의 결과와는 달리 강하게 형광이 나타나는 것을 알 수 있었다. 따라서, HNF-1a 유전자 엑손9 구간의 5613번째 뉴클레오타이드 바로 뒤에 뉴클레오타이드 A를 삽입한 돌연변이를 쉽게 탐지할 수 있다.

실시예6: 기관 상에서의 매트릭스의 직접 제조를 통한 바이오칩 제조
실시예6: 기관 상에서의 매트릭스의 직접 제조를 통한 바이오칩 제조

본 발명의 매트릭스는 기관과는 별도의 용기에서 제조될 수 있을 뿐만 아니라, 기관상에서 직접 제조될 수 있다.

카보네이트 완충용액 (0.25mM, pH 9.5)에 올리고뉴클레오타이드 프로브 (5' - tgttctctgtcttg - 3' : 서열번호35), 실시예1에서 합성된 말단 에폭시기를 갖는 방사형 폴리에틸렌글리콜 유도체, 실시예2에서 제조된 다이아민 가교제를 1:8:8의 비율로 혼합하였다. 이때 올리고뉴클레오타이드의 농도는 $400 \mu\text{M}$ 을 넘지 않도록 하였다. 다음으로, 상기 혼합용액에 동일한 부피의 DMSO를 섞은 후, 아민기를 갖도록 표면처리된 유리 표면 위에 스포팅하였다. 스포팅이 끝나면, 칩을 온도 60℃와 습도 40%로 제어된 오븐에 넣고, 1시간 동안 배양한 다음, 석시닉 하하이드라이드 (succinic anhydride)로 후처리를 수행하였다. 이러한 후처리는 반응에 참여하지 않은 유리 기관 표면의 아민기, 에폭시기를 갖는 방사형 폴리에틸렌 유도체의 에폭시기 및 프로브의 아민기가 비특이적 반응을 일으키는 것을 방해한다.

상기에서 얻어진 바이오칩 상에서 프로브와 핵산의 혼성화 반응을 수행한 후 스캐닝한 결과를 도 3에 나타내었다. 이때 사용한 표적 핵산은 상기 프로브와 상보적인 합성 올리고뉴클레오타이드이었다. 도3에서 C는 본 실시예에 의하여 제조된 바이오칩에 대한 결과이고, B는 실시예4의 방법으로 제조된 바이오칩에 대한 결과이고, A는 DNA 용액만을 유리기관

에 스프팅하여 제조된 바이오칩에 대한 결과를 나타낸다. 도3에서 볼 수 있는 바와 같이, C의 형광강도는 B의 경우보다 5~7배 증가하였고, A의 형광강도는 B의 경우보다 2~3배 증가하였다.

발명의 효과

이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 의하면, 표면으로부터 공간적으로 돌출되어 있는 형태에 의한 3차원적인 구조를 갖는 바이오칩의 생산이 가능하여 칩의 민감도를 획기적으로 증가시킬 뿐만 아니라, 저렴한 비용과 간단하고 효율적인 공정에 의해 수용액상에서 칩을 제조할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

기관상에 말단에 에폭시기를 가진 방사형 폴리에틸렌글리콜 유도체와 친수성 폴리머 가교제를 함유하는 매트릭스와 프로브를 포함하는 하이드로 겔을 형성하는 단계를 포함하는 바이오칩의 제조방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 말단에 에폭시기를 가진 방사형 폴리에틸렌글리콜 유도체와 상기 친수성 폴리머 가교제의 매트릭스를 형성하는 단계와 상기 매트릭스에 프로브를 반응시켜 매트릭스-프로브 접합체를 제조하는 단계를 포함하는 하이드로 겔 바이오칩의 제조방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 말단에 에폭시기를 가진 방사형 폴리에틸렌글리콜 유도체, 친수성 폴리머 가교제 및 프로브를 포함하는 혼합 용액을 형성하는 단계와 상기 혼합 용액을 상기 기관상에 고정화하는 단계를 포함하는 하이드로 겔 바이오칩의 제조방법.

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 고정화의 온도는 40℃~70℃이고, 습도는 60%~30%인 것을 특징으로 하는 하이드로 겔 바이오칩의 제조방법.

청구항 5.

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 친수성 폴리머 가교제는 60~100,00의 평균 분자량을 가지고, 히드록시기, 아미노기 또는 티올기를 가지는 폴리에틸렌글리콜임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브는 핵산(DNA, RNA 또는 PNA), 단백질 또는 올리고펩타이드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제1항 또는 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관은 아민기를 가진 표면층을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기판은 유리, 석영, 실리콘, 플라스틱, 폴리프로필렌, 폴리카보네이트 또는 활성화된 아크릴아마이드로 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제1항 내지 제4항의 방법에 의하여 제조되는 하이드로 젤 바이오칩.

청구항 10.

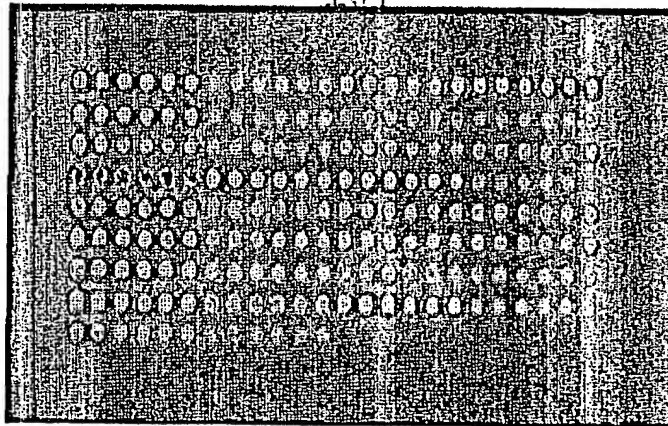
제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따라 제조된 하이드로 젤 바이오칩에 프로브와 결합하는 표적 물질을 포함하는 시료를 적용하는 단계와 상기 프로브에 특이적으로 결합된 표적 물질을 검출하는 단계를 포함하는 프로브와 표적 물질간의 결합을 분석하는 방법.

청구항 11.

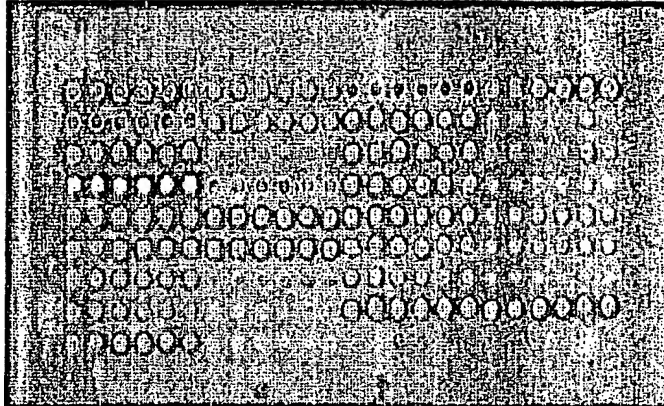
제10항에 있어서, 상기 표적 물질은 형광물질이 부착된 바이오물질인 것을 특징으로 하는 방법.

도면

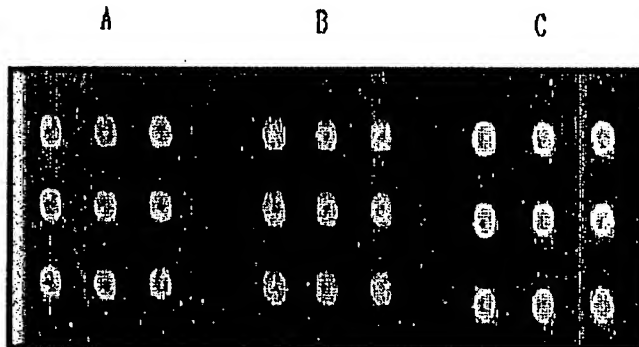
도면 1



도면 2



도면 3



- <110> SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.
- <120> A method of preparing a hydrogel biochip by using PEG derivatives
- <160> 35
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 15
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> A probe complementary to promoter region of HNF-1a gene, in which the central 't' base pairs with the 432nd base of the wild type

promoter.

<400> 1
tgaactttgg acttc 15

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A probe complementary to promoter region of HNF-1a gene of which the 432nd base has a point mutation(A-C).

<400> 2
tgaacttggg acttc 15

<210> 3

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A probe complementary to promoter region of HNF-1a gene, in which the central 'g' base pairs with the 592nd base of the wild type promoter.

<400> 3
gttttggggg ggcag 15

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A probe complementary to promoter region of HNF-1a gene of which the 592nd base has a point mutation(C-G).

<400> 4
gttttggcgg ggcag 15

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A probe complementary to exon 1 region of HNF-1a gene, in which the central 'g' base pairs with the 733rd base of the wild type exon 1.

<400> 5
tgcagctggc tcagt 15

<210> 6

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A probe complementary to exon 1 region of HNF-1a gene of which the 733rd base has a point mutation(C-T).

<400> 6
tgcagctagc tcagt 15

<210> 7
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 1 region of HNF-1a gene, in which the central 'g' base pairs with the 806th base of the wild type exon 1.
 <400> 7
 gcactgggtg agccg 15
 <210> 8
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 1 region of HNF-1a gene of which the 806th base has a point mutation(C-T).
 <400> 8
 gcactggatg agccg 15
 <210> 9
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 1 region of HNF-1a gene, in which the central 'g' base pairs with the 856th base of the wild type exon 1.
 <400> 9
 caagggggag tcctg 15
 <210> 10
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 1 region of HNF-1a gene of which the 856th base has a point mutation(C-T).
 <400> 10
 caaggggaag tcctg 15
 <210> 11
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 1 region of HNF-1a gene, in which the central 'g' base pairs with the 875th base of the wild type exon 1.
 <400> 11
 cggtcgagg gagct 15
 <210> 12
 <211> 15

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 1 region of HNF-1a gene of which the 875th-879th bases are deleted.
 <400> 12
 ggcggtcgag ctggc 15
 <210> 13
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 2 region of HNF-1a gene, in which the central 't' base pairs with the 1778th base of the wild type exon 2.
 <400> 13
 accatcttcg ccaca 15
 <210> 14
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 2 region of HNF-1a gene of which the 1778th base has a point mutation(A-G).
 <400> 14
 accatctccg ccaca 15
 <210> 15
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 2 region of HNF-1a gene, in which the central 't' base pairs with the 1812nd base of the wild type exon 2.
 <400> 15
 cacaacatcc cacag 15
 <210> 16
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 2 region of HNF-1a gene of which the 1812nd base has a point mutation(A-T).
 <400> 16
 cacaacaacc cacag 15
 <210> 17
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

- <223> A probe complementary to exon 2 region of HNF-1a gene, in which the central 'g' base pairs with the 1910th base of the wild type exon 2.
- <400> 17
gcggggccgcc ctgta 15
- <210> 18
- <211> 15
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> A probe complementary to exon 2 region of HNF-1a gene of which the 1910th base has a point mutation(C-T).
- <400> 18
gcggggccacc ctgta 15
- <210> 19
- <211> 15
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> A probe complementary to exon 2 region of HNF-1a gene, in which the central 'g' base pairs with the 1940th base of the wild type exon 2.
- <400> 19
acctctcgcct gcttg 15
- <210> 20
- <211> 15
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> A probe complementary to exon 2 region of HNF-1a gene of which the 1940th base has a point mutation(C-T).
- <400> 20
acctctcact gcttg 15
- <210> 21
- <211> 15
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> A probe complementary to exon 3 region of HNF-1a gene, in which the central 'g' base pairs with the 2659th base of the wild type exon 3.
- <400> 21
aaggggcgga ggaac 15
- <210> 22
- <211> 15
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> A probe complementary to exon 3 region of HNF-1a gene of which the 2659th base has a point mutation(C-T).

<400> 22
aaggggcaga ggaac 15
<210> 23
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> A probe complementary to exon 3 region of HNF-1a gene, in which the central 'c' base pairs with the 2667th base of the wild type exon 3.

<400> 23
gaggaaccgt ttcaa 15
<210> 24
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> A probe complementary to exon 3 region of HNF-1a gene of which the 2667th base has a point mutation(G-A).

<400> 24
gaggaactgt ttcaa 15
<210> 25
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> A probe complementary to exon 4 region of HNF-1a gene, in which the central 'g' base pairs with the 3297th base of the wild type exon 4.

<400> 25
cacctccgtg acgag 15
<210> 26
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> A probe complementary to exon 4 region of HNF-1a gene of which the 3297th base has a point mutation(C-T).

<400> 26
cacctccatg acgag 15
<210> 27
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> A probe complementary to exon 4 region of HNF-1a gene, in which the central 'g' base pairs with the 3305th base of the wild type exon 4.

<400> 27
tagacacgca cctcc 15

<210> 28
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 4 region of HNF-1a gene of which
 the 3305th base has a point mutation(C-T).
 <400> 28
 tagacacaca cctcc 15
 <210> 29
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 4 region of HNF-1a gene, in which
 the central 'c' base pairs with the 3332nd base of the wild type
 exon 4.
 <400> 29
 caaccggcgc aaaga 15
 <210> 30
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 4 region of HNF-1a gene of which
 the 3332nd base has a point mutation(G-A).
 <400> 30
 caaócggtgc aaaga 15
 <210> 31
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 9 region of HNF-1a gene, in which
 the central 't' base pairs with the 5613rd of the wild type exon
 9.
 <400> 31
 cctgagatgc cggcg 15
 <210> 32
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 9 region of HNF-1a gene in which
 'a' base is inserted after the 5613rd base of exon 9.
 <400> 32
 cctgagattg ccggc 15
 <210> 33
 <211> 15
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 9 region of HNF-1a gene, in which the central 'g' base pairs with the 5688th base of the wild type exon 9.
 <400> 33
 tggcgctgag cgggt 15
 <210> 34
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A probe complementary to exon 9 region of HNF-1a gene in which 'tc' bases are inserted after the 5688th base of the exon 9.
 <400> 34
 tggcgctgag agccg 15
 <210> 35
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> a synthetic oligonucleotide probe
 <400> 35
 tggtctcttg tcttg 15